

О. Ф. КЭЭРБЕРГ, Э. Я. ВЯРК, Х. И. КЭЭРБЕРГ, Т. Р. ПЯРНИК

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ВКЛЮЧЕНИЯ C^{14} В ПРОДУКТЫ ФОТОСИНТЕЗА У ЛИСТЬЕВ ФАСОЛИ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 2 II 1970)

Одним из способов применения радиоактивного углекислого газа при исследовании химизма фотосинтетического восстановления CO_2 является изучение кинетики включения C^{14} в разные продукты стационарного фотосинтеза. Временные кривые радиоактивности промежуточных продуктов фотосинтеза дают возможность установить последовательность образования и величины стационарных фондов этих соединений, а также рассчитать скорость прохождения углерода через отдельные синтетические пути, участвующие в процессе восстановления CO_2 (¹⁻³). Определение этих параметров у зеленых одноклеточных водорослей позволило выяснить многие важные черты химизма фиксации CO_2 (²⁻⁶). Однако описанный метод не нашел последовательного применения при исследовании фотосинтеза высших растений. В то же время проведение точного кинетического анализа позволило бы более четко решить ряд вопросов, касающихся химизма и регуляции фотосинтетического восстановления CO_2 листьями высших растений, а также сравнить этот процесс у последних с таким же у одноклеточных водорослей. В настоящей работе мы сделали попытку применить кинетический метод при исследовании фотосинтеза у одного представителя высших растений — фасоли. С этой целью строили временные кривые включения C^{14} в продукты фотосинтеза и на основе их рассчитали некоторые кинетические параметры, характеризующие процесс восстановления CO_2 у данной культуры.

Растения фасоли (*Phaseolus vulgaris*, сорт «Масличная ранняя») выращивали под люминесцентными лампами. Диски из первых после семядолей листьев 14-дневных растений в течение разного промежутка времени (0,5; 1,5; 3; 5; 7,5, и 10 мин.) экспонировали в камере, содержащей $C^{14}O_2$ (⁷). Концентрация углекислого газа в камере составляла 0,03%, удельная радиоактивность $C^{14}O_2$ 690 мС/л. Для освещения применяли 500-ваттную прожекторную лампу, из суммарной радиации которой при помощи жидкого светофильтра (5 см слой 1% водного раствора $CuSO_4$) была выделена фотосинтетически активная радиация (ф.а.р.). Интенсивность падающей на диск ф.а.р. 25 мвт/см². До экспозиции в $C^{14}O_2$ диски освещали вне камеры светом той же интенсивности для достижения стационарного состояния фотосинтеза. В каждом варианте экспонировали 6 дисков, вырезанных из листьев разных растений. Сразу после экспозиции диски фиксировали в кипящем 80-процентном этаноле. Продукты фотосинтеза экстрагировали растворами этанола разных концентраций при различных значениях pH и разделяли при помощи двухмерной хроматографии на бумаге (⁸). Локализацию меченых продуктов на хроматограммах находили радиоавтографически. После этого отдельные соединения элюировали с хроматограмм и определяли их радиоактивность в импульсах за 1 мин. С учетом удельной радиоактивности углекислого газа и эффективности счета полученные результаты выражали в абсолютных единицах — в микромолях C^{14} на 1 дм² (²), которые означают количество углерода ($C^{12} + C^{14}$), включенного в данное соединение за время экспозиции листа площадью 1 дм²

в среде с $C^{14}O_2$ (рис. 1А). Наряду с этим вычисляли относительную радиоактивность материала (рис. 1Б).

Из рис. 1А видно, что общая радиоактивность материала возрастает пропорционально продолжительности экспозиции. Общая скорость поглощения CO_2 составляет $185,9 \mu\text{моль } C^{14}$ на 1 дм^2 в час ($8,18 \text{ мг } CO_2$ на 1 дм^2 в час). Хорошее совпадение экспериментальных точек с прямой (отклонения не превышают 5%) показывает, во-первых, что в течение всего опыта сохранялась стационарная скорость фотосинтеза и, во-вторых, что выбранное нами количество дисков в одном варианте обеспечило достаточно хорошее усреднение случайных отклонений, обусловленных неоднородностью растительного материала.

Из отдельных соединений наиболее быстро метятся фосфоглицериновая кислота (ФГК), фосфорные эфиры сахаров (ФЭС) и яблочная кислота. На это указывают кривые относительной радиоактивности этих соединений (рис. 1Б), которые, в отличие от остальных продуктов фотосинтеза, имеют отрицательный угол наклона при самых коротких экспозициях, примененных в опыте. В то же время кривые абсолютной радиоактивности ФГК, ФЭС и яблочной кислоты (рис. 1А) образуют с осью абсцисс положительный угол. Экстраполяция этих кривых в сторону коротких экспозиций и определение угла наклона в нулевой момент времени показывают, что углерод C^{14} включается в ФГК со скоростью около $130 \mu\text{моль/дм}^2 \cdot \text{час}$, а в яблочную кислоту — $9 \mu\text{моль/дм}^2 \cdot \text{час}$. Эти значения составляют, соответственно, 70 и 5% от общей скорости фиксации CO_2 . Приблизительно такие же результаты были получены Дж. Бассэмом и М. Кирк (2) в опытах с хлореллой. Следовательно, первичная фиксация CO_2 листьями фасоли, так же как и клетками зеленых водорослей, происходит в основном за счет карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата с образованием ФГК, в то время как карбоксилирование фосфоэнолпирувиновой кислоты (с образованием яблочной кислоты) имеет в количественном отношении лишь второстепенное значение.

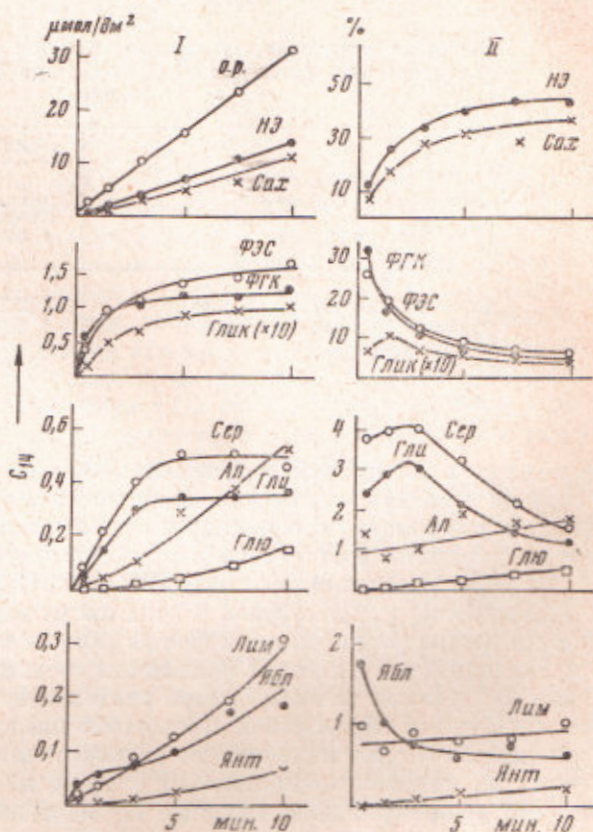


Рис. 1. Кинетика включения C^{14} в продукты стационарного фотосинтеза при экспозиции листьев фасоли в среде с $C^{14}O_2$. Радиоактивность выражена количеством C^{14} (I) и в процентах от общей радиоактивности материала (II). О.р. — общая радиоактивность материала, НЭ — нерастворимые в этаноле соединения, Сах — сахара, ФЭС — фосфорные эфиры, ФГК — фосфоглицериновая кислота, Глик — гликолевая кислота, Сер — серин, Ал — аланин, Гли — глицин, Глю — глютаминовая кислота, Лим — лимонная кислота, Ябл — яблочная кислота, Янт — янтарная кислота

Радиоактивность ФГК и ФЭС возрастает быстро в течение первых 2—3 мин. После этого угол наклона кривой абсолютной радиоактивности уменьшается и кривая постепенно приближается к некоторому постоянному уровню. Это значит, что фонды ФГК и ФЭС насыщены C^{14} , т. е. их удельная радиоактивность становится равной удельной радиоактивности углекислого газа. В принятых нами единицах ($\mu\text{мол}/\text{дм}^2$) уровень насыщения (высота плато кривой) равен количеству углерода в стационарных

Таблица 1

Величина стационарных фондов и время их полунасыщения C^{14} для некоторых промежуточных продуктов фотосинтеза у листьев фасоли

Соединение	Величина фонда		Время полунасыщения фонда C^{14} , мин.
	$\mu\text{мол. } C^{14} \text{ на } 1 \text{ дм}^2$	$\mu\text{мол. соедин. на } 1 \text{ дм}^2$	
Фосфоглицериновая кислота	1,20	0,40	0,5
Фосфорные эфиры сахаров	1,50		1,2
Гликолевая кислота	0,10	0,05	1,6
Глицин	0,34	0,17	1,7
Серин	0,50	0,17	1,8

фондах этих соединений. При делении этого значения на количество атомов углерода в молекуле данного соединения получим величину стационарного фонда в микромолях соединения на 1 дм^2 листовой поверхности. Для некоторых продуктов фотосинтеза эти данные представлены в табл. 1.

Быстрое насыщение фондов ФГК и ФЭС было отмечено и в опытах с водорослями (¹, ²). Однако, в отличие от водорослей (³, ⁵, ⁹), в листьях фасоли насыщаются быстро и фонды гликолевой кислоты, глицина и серина. По-видимому, в листьях фасоли эти соединения являются промежуточными продуктами некоего быстро протекающего пути биосинтеза. Информацию о путях образования гликолевой кислоты, глицина и серина при фотосинтезе можно получить из рассмотрения последовательности насыщения их фондов радиоактивным углеродом. Как известно, насыщение некоего промежуточного продукта C^{14} наступает всегда позже, чем насыщение его непосредственного предшественника в данной цепи реакций (⁶), т. е. временная последовательность насыщения фондов промежуточных продуктов C^{14} соответствует последовательности их образования при фотосинтезе. Однако, так как установить точный момент насыщения фонда трудно, мы определяли продолжительность экспозиции, необходимой для полунасыщения фондов C^{14} . Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что фонды рассмотренных соединений достигают полунасыщения в следующей последовательности: ФГК → ФЭС → гликолевая кислота → глицин → серин. Такая последовательность характерна для промежуточных продуктов гликолатного пути (¹⁰). На основе этих и некоторых других данных, полученных нами ранее (¹¹), можно предполагать, что в листьях фасоли быстронасыщающие фонды гликолевой кислоты, глицина и серина образуются через гликолатный путь превращения углерода. При этом следует обратить внимание на то обстоятельство, что фонд гликолевой кислоты насыщается C^{14} позже, чем фонды ФЭС. Это подтверждает гипотезу об образовании гликолевой кислоты из фосфорных эфиров сахаров (⁵, ⁹, ¹⁰, ¹²).

Предполагая, что гликолевая кислота, глицин и серин образуются в указанной выше последовательности, можно рассчитать скорость прохождения углерода через фонды этих соединений. Это дает возможность количественно оценить долю гликолатного пути в фотосинтетическом ме-

таболизме углерода. При расчете мы исходили из формулы (1):

$$dX_B/dt = R/[B](X_A - X_B), \quad (1)$$

где R — скорость прохождения углерода через фонды промежуточных продуктов, X_B — степень насыщения фонда некоего промежуточного продукта В C^{14} , X_A — степень насыщения фонда промежуточного продукта А, являющегося непосредственным предшественником продукта В в данной цепи реакций, $[B]$ — величина стационарного фонда В. В принятых нами единицах радиоактивность промежуточного продукта В (P_B) выражается:

$$P_B = [B]X_B.$$

Следовательно, формулу (1) можно переписать в виде:

$$dP_B/dt = R(X_A - X_B),$$

откуда

$$R = (dP_B/dt)/(X_A - X_B). \quad (2)$$

Эту формулу мы применили для расчета прохождения углерода через фонд глицина. По углу касательной кинетической кривой глицина можно определить скорость прироста радиоактивности глицина (dP_B/dt), которая при продолжительности экспозиции $t = 1,5$ мин. равняется $6,6$ μ мол. C^{14} на 1 dm^2 в час. Степень насыщения фонда глицина C^{14} в этот момент $X_B \approx 0,43$. Степень насыщения фонда гликолевой кислоты (предшественника глицина) $X_A \approx 0,55$. Подставляя эти значения в формулу (2), получим: $R = 6,6/(0,55 - 0,43) = 55$ μ мол. C^{14} на 1 dm^2 в час, что составляет около 30% от общей скорости фиксации CO_2 . Из этого следует, что в условиях нашего опыта по гликолатному пути превращается почти $1/3$ всего углерода, фиксированного листьями фасоли при фотосинтезе.

Что касается остальных соединений, не перечисленных в табл. 1, то в течение первых 10 мин. их фонды не насыщаются C^{14} . Среди них наибольшей радиоактивностью обладают сахароза и нерастворимые в этаноле соединения. Из рис. 1Б видно, что при увеличении продолжительности экспозиции относительная радиоактивность сахарозы и нерастворимого остатка непрерывно возрастает, достигая к концу 10-минутной экспозиции, соответственно, 35 и 45% от общей радиоактивности материала. Такое изменение относительной радиоактивности характерно для конечных продуктов фотосинтеза. При этом анализ нерастворимого остатка показал, что в этой фракции наиболее сильно метится крахмал, радиоактивность которого составляет до 90% от общей радиоактивности фракции. Из этого следует, что основными конечными продуктами фотосинтеза у листьев фасоли являются углеводы.

Приведенные выше рассуждения показывают, что анализ кинетических данных позволяет выяснить многие важные характеристики процесса восстановления CO_2 . Возможность получения этой информации на примере листьев фасоли указывает на перспективность применения описанного метода при исследовании фотосинтеза у высших растений.

Авторы выражают благодарность Н. П. Воскресенской за ценные замечания при обсуждении результатов настоящей работы.

Институт экспериментальной биологии

Академии наук ЭССР

Таллин

Поступило

28 I 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Calvin, P. Massini, *Experientia*, 8, 445 (1952). ² J. A. Bassham, M. Kirk, *Biochim. et biophys. acta*, 43, 447 (1960). ³ D. C. Smith, J. A. Bassham, M. Kirk, *Biochem. et biophys. acta*, 48, 299 (1961). ⁴ J. A. Bassham, A. A. Benson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1760 (1954). ⁵ J. A. Bassham, B. Morawiecka, M. Kirk, *Biochim. et biophys. acta*, 90, 542 (1964). ⁶ J. A. Bassham, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 15, 101 (1964). ⁷ Т. Пярник, О. Кээрберг, Изв. АН ЭССР, Биол., 15, 32 (1966). ⁸ Э. Вярк, О. Кээрберг и др., Изв. АН ЭССР, Биол., 17, 337 (1968). ⁹ G. G. Pritchard, W. J. Griffin, C. P. Whittingham, *J. Exp. Bot.*, 13, 176 (1962). ¹⁰ R. Rabson, N. E. Tolbert, P. C. Kearney, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 98, 154 (1962). ¹¹ Э. Вярк, О. Кээрберг и др., Изв. АН ЭССР, Биол., 19, 3 (1970). ¹² A. T. Wilson, M. Calvin, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5948 (1955).